Arbeit ausgeführt unter Leitung von Prof. Dr. E. Rothlin, Basel

Die isolierte Samenblase des Meerschweinchens als biologisches Testobjekt zur quantitativen Differenzierung der sympathikolytischen Wirkung der genuinen Mutterkornalkaloide und ihrer Dihydroderivate

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der medizinischen Fakultät der Universität

BASEL

vorgelegt von

JOLANDA BRÜGGER

von Churwalden (Kt. Graubünden)

Basel 1945

Druck von Benno Schwabe & Co., Basel

Arbeit ausgeführt unter Leitung von Prof. Dr. E. Rothlin, Basel

Die isolierte Samenblase des Meerschweinchens als biologisches Testobjekt zur quantitativen Differenzierung der sympathikolytischen Wirkung der genuinen Mutterkornalkaloide und ihrer Dihydroderivate

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät der Universität
BASEL

vorgelegt von

JOLANDA BRÜGGER
von Churwalden (Kt. Graubünden)

Basel 1945
Druck von Benno Schwabe & Co., Basel

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag
von Professor Dr. *E. Rothlin*
Tag der Promotion: am 9. März 1945

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Erschienen in den Helv. Physiol. Acta **3**, 117–134 (1945)

Die pharmakologische Wirksamkeit der genuinen Mutterkornalkaloide ist durch zwei typische, aber grundverschiedene Wirkungskomponenten gekennzeichnet: die muskuläre und die sympathikolytische bzw. adrenalinhemmende Wirkung. Die Hemmung bzw. Aufhebung der Adrenalinwirkung durch Sekalealkaloide wurde zuerst von *Sollmann* und *Brown* (1) beobachtet und dann von *Dale* (2) eingehend untersucht und beschrieben. *Rothlin* (3) wies darauf hin, daß bei den einzelnen Vertretern der genuinen Mutterkornalkaloide die sympathikolytische Wirkung mit derjenigen auf die glatte Muskulatur des Uterus nicht parallel geht. Noch viel ausgesprochener ist dieser Unterschied bei den hydrierten Mutterkornalkaloiden, bei welchen die Uteruswirksamkeit praktisch fehlt, während die sympathikolytische Wirkung noch ausgesprochener ist als bei den genuinen Stammsubstanzen (*Rothlin* [4]). Die Adrenalinhemmung durch Mutterkornalkaloide hat sich für den quantitativen biologischen Nachweis kleinster Alkaloidmengen, z. B. im Fluidextrakt, als brauchbarer erwiesen als die kontrahierende Wirkung am isolierten Uterus. Für den quantitativen Nachweis der Adrenalinhemmung sind bisher zwei Testobjekte in Anwendung: der isolierte Kaninchen-Uterus nach *Broom* und *Clark* (5) und der isolierte Dünn- oder Dickdarm des Meerschweinchens und des Kaninchens (*Rothlin* [6], *Planelles* [7], *Issekutz* und *Leinzinger* [8]). *Rothlin* (9) wies zum ersten Mal die adrenalinhemmende Wirkung des Ergotamins an der isolierten Samenblase des Meerschweinchens nach und stellte fest, daß dieses Testobjekt für Mutterkornalkaloide eine wesentlich größere Empfindlichkeit aufweist als der isolierte Kaninchen-Uterus und der Dünndarm. Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der isolierten Samenblase des Meerschweinchens auf ihre Eignung als Testobjekt für den quantitativen Nachweis sympathikolytischer Substanzen. Vor allem interessiert die Frage, inwieweit es gelingt, mit der für Mutterkornalkaloide sehr empfindlichen isolierten Samenblase

eine bessere Differenzierung der verschiedenen genuinen Mutterkornalkaloide und deren hydrierten Derivaten zu erzielen, als dies bisher möglich war. Der Fragestellung entsprechend zerfällt die Arbeit in zwei Teile:

1. Untersuchungen der methodischen Grundlagen für die Eignung der isolierten Samenblase als Testobjekt zum Nachweis der sympathikolytischen bzw. adrenalinhemmenden Substanzen.

2. Darstellung der Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der sympathikolytischen Wirkung von 8 verschiedenen Mutterkornalkaloiden, gewonnen mit der unter 1 beschriebenen Methode.

I. Methodischer Teil

Nach *Langley* und *Anderson* (10) ist die Samenblase des Meerschweinchens als schlauchförmiger uterus masculinus aufzufassen, dessen Längs- und Ringmuskulatur vom Sympathikus innerviert sind. Die Frage, ob die Samenblase nur sympathisch oder auch parasympathisch innerviert ist, wie dies *Waddel* (11) und *Müller* (12) auf Grund morphologischer Untersuchungen annehmen, ist zwar bisher nicht geklärt, tatsächlich sind aber beide physiologischen Ueberträgerstoffe des vegetativen Nervensystems, Adrenalin wie Acetylcholin, wirksam, und beide werden ausschließlich mit Kontraktion beantwortet (*Waddel* [11], *Rothlin* [13], *Bacq* [14]). Ferner ist bekannt, daß Adrenalin durch Ergotamin, nicht aber durch Atropin, Acetylcholin durch Atropin, nicht aber durch Ergotamin gehemmt werden (13).

Als Testorgane dienten die Samenblasen geschlechtsreifer Meerschweinchen, im Gewicht von 450–700 g. Erfahrungsgemäß reagieren die Organe jüngerer Tiere schlechter und unregelmäßiger. Vor dem Versuch werden die Tiere 2 Tage auf Hafer gesetzt, wodurch die Erregbarkeit der Organe gesteigert und regelmäßiger wird. Die beiden Samenblasen des durch Nackenschlag getöteten Tieres werden sorgfältig in die nebeneinanderliegenden Gefäße des Thermostaten von 38° C gebracht. Das von *Bacq* empfohlene Ausdrücken des Blaseninhaltes erachten wir nicht für angezeigt. Als Nährflüssigkeit dient glukosehaltiger Starling-Ringer mit einem p_H von 7,2–7,4. Die Längsveränderungen der Organe werden mit fünffacher Hebelübertragung registriert. Vor Beginn der Untersuchungen ruhen die Organe bei einer der Größe des Organs angepaßten Belastung von 1–2 g während einer halben Stunde zur Gewöhnung an das Milieu (Ruhetonus); erst dann setzt die Reaktionsbereitschaft ein. Untersuchungen über den Einfluß der O_2-Zufuhr haben ergeben, daß eine normale Erregbarkeit nur bei ständiger O_2-Zufuhr erzielt wird.

Die Reaktionsweise der isolierten Samenblase auf Adrenalin

Die Absicht der Verwendung der isolierten Samenblase als Testobjekt für den quantitativen Nachweis der Adrenalinhemmung durch Sympathikolytika setzt die Kenntnis der Reaktionsweise dieses Organs gegenüber Adre-

nalin voraus. Zu berücksichtigen sind außer den schon erwähnten allgemeinen Versuchsbedingungen: die qualitative Reaktionsweise, die Empfindlichkeit, der Sensibilisierungsvorgang, die Reversibilität, die Repetierbarkeit einer eventuell stabilisierten Reaktion in geeigneten Intervallen, die Ermüdungs- und die rhythmischen Erscheinungen. Vor allem ist es das Kriterium einer stabilisierten, genügend langen, gleichmäßigen Reaktionsweise, welches für die quantitative biologische Titration erfordert wird.

a) Die qualitative Reaktionsweise auf Adrenalin.

In keinem der vielen hundert Versuche ist eine erschlaffende Wirkung durch Adrenalin beobachtet worden. Jeder überschwellige Adrenalin-Reiz führt nach einer Latenzzeit von einigen Sekunden zu einer mehr oder weniger ausgesprochenen Tonuserhöhung bzw. Kontraktion, die von rhythmischen Kontraktionen gefolgt wird. Phänomenologisch ist die Wirkung durch einen rasch ansteigenden und langsamer absteigenden Schenkel charakterisiert. Während rhythmische Unterbrechungen am aufsteigenden Schenkel sehr selten sind, treten sie auf der Höhe der maximalen Wirkung und am absteigenden Schenkel regelmäßig auf. Sie dauern einige Minuten und hören in der Regel auf, bevor das Ausgangsniveau erreicht ist (Abb. 1). Die für die betreffende Dosis maximale Wirkung hält sich in der Regel nicht länger als 1–2 Minuten, worauf die allmählich und rhythmisch verlaufende Erschlaffung einsetzt. Die Adrenalin-Wirkung erschöpft sich somit selbst, bald langsamer, bald rascher (Abb. 1), für eine mittlere Kontraktion durchschnittlich innerhalb 15 Minuten. Durch Auswaschen des Adrenalins setzt nach kurzer Latenzzeit eine rasch verlaufende Erschlaffung ein, gleichzeitig wird ein bestehender Rhythmus unterbrochen. Ein sogenannter Auswascheffekt, d. h. eine gleichsinnige Reaktion wie nach Zusatz des Adrenalins, konnte im Anschluß an das Auswaschen mit Ringer nie beobachtet werden.

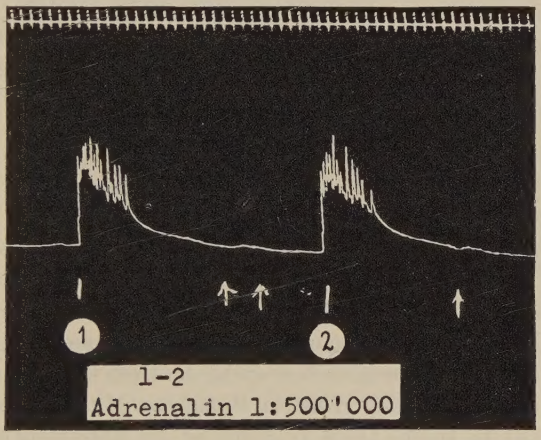


Abb. 1. Reaktionsablauf an der isolierten Samenblase des Meerschweinchens auf Adrenalin-Reiz 1:500000. ↑ = Auswaschen des Adrenalins. Zeit in Minuten.

b) Die Empfindlichkeit auf Adrenalin.

Die isolierte Samenblase des Meerschweinchens weist gegenüber Adrenalin eine recht geringe Empfindlichkeit auf; nur selten liegt die Adrenalindosis für eine mittlere Kontraktion unter der Konzentration von 1:2000000. Die in den vorliegenden Versuchen angewandten Dosen für brauchbare mittlere Reaktionen liegen zwischen 1:500000 und 1:2000000. Die geringe Empfindlichkeit dieses Testobjektes ergibt sich vor allem aus dem Vergleich mit derjenigen anderer isolierter Organe, wie des isolierten Kaninchenuterus mit 1:10–80000000, des Kaninchenohres bis 1:100000000 und mehr, des isolierten Dünn- und Dickdarmes des Meerschweinchens und Kaninchens 1:20–50000000; sie entspricht vielmehr der Empfindlichkeit der isolierten Arterien vom Rind oder jener der isolierten Organe des Frosches (*Rothlin* [15]). Einen Einblick in die Beziehung zwischen Reizzuwachs und Reizerfolg gibt Tabelle 1, in welcher der Mittelwert von 3 gleichen Adrenalinversuchen

Tabelle 1

Kontraktion der isolierten Samenblase des Meerschweinchens auf Adrenalin
Mittelwerte von je 3 Versuchen für 3 verschiedene Adrenalin-Reize bzw. -Konzentrationen

Adrenalin-Konzentration	Hubhöhe in mm			
	Organ 1	Organ 2	Organ 3	Organ 4
1:2000000	12,6	12,0	4,0	2,0
1:1000000	17,6	24,5	13,3	12,0
1: 500000	20,0	34,0	14,0	14,5

für die 3 Adrenalinkonzentrationen 1:2000000, 1:1000000 und 1:500000 erfaßt ist. Dabei sei betont, daß es sich um Untersuchungen in der stabilisierten Erregbarkeitsphase handelt (siehe später). Es sind je 2 Beispiele mit hoher und niedriger Empfindlichkeit ausgewählt. Bei Verdoppelung des Reizes reagieren erstere zwar deutlich stärker, die letzteren aber mit einer noch wesentlich größeren Zunahme. Mit dem Uebergang von der doppelten auf die 4fache Dosis hingegen ist der Reizerfolg bei den an sich empfindlicheren Organen stärker als bei den weniger empfindlichen Organen. Für den Versuch der Sympathikolyse wurde in diesen Fällen mit der Dosis von 1:1000000 gearbeitet. Die Empfindlichkeit dieses Testobjektes ist eine Organ-Eigenart; sehr häufig besitzen die beiden Samenblasen desselben Tieres eine verschiedene Adrenalin-Empfindlichkeit. Die basale Hälfte erweist sich in der Regel 2mal wirksamer als die terminale. Wir haben durchwegs die ungeteilten Samenblasen verwendet. Wie oben erwähnt, ist das Alter der Tiere insofern von Bedeutung, als die Samenblase junger Tiere gegenüber Adrenalin weniger empfindlich ist als jene älterer Tiere, deshalb wurden nur Tiere mit einem Mindestgewicht von 450 g verwendet.

c) Reversibilität bzw. Repetierbarkeit der Adrenalinwirkung.

Die Adrenalin-Reaktion an der Samenblase ist autoreversibel und sehr rasch auswaschbar. Für die Eignung des Testobjektes für eine quantitative Bestimmung sympathikolytischer Substanzen ist nicht nur die prompte Reversibilität, sondern ebenso die quantitative Repetierbarkeit ein unbedingtes Postulat. Denn es muß die Sicherheit bestehen, daß die Adrenalin-Empfindlichkeit vor und nach der Zugabe des Sympathikolytikums dieselbe ist, dient sie doch als Grundlage für die quantitative Bestimmung der Adrenalinhemmung.

Nach der halbstündigen Anpassungspause wird mit der Adrenalinkonzentration 1:2000000 begonnen und je nach dem Reaktionsausfall dieselbe Konzentration weiter angewendet oder erhöht. Wie die Abbildung 2 zum Ausdruck bringt, sind die 3 aufeinanderfolgenden Reaktionen auf dieselbe Konzentration zunehmend stärker. Die Samenblase weist somit eine *Sensibilisierung* durch aufeinanderfolgende, identische Adrenalin-Reize auf. Die Phase der Sensibilisierung tritt zu Beginn der Untersuchung auf und ist in über 50% der Fälle in mehr oder weniger ausgesprochener Weise vorhanden. Diese Sensibilisierungsphase ist eine sehr häufige Erscheinung an isolierten Organen; wir sehen sie ebenso ausgesprochen am isolierten Kaninchenuterus auf Adrenalin. Unter anderem ist sie der Ausdruck der allmählichen Anpassung an das neue Milieu.

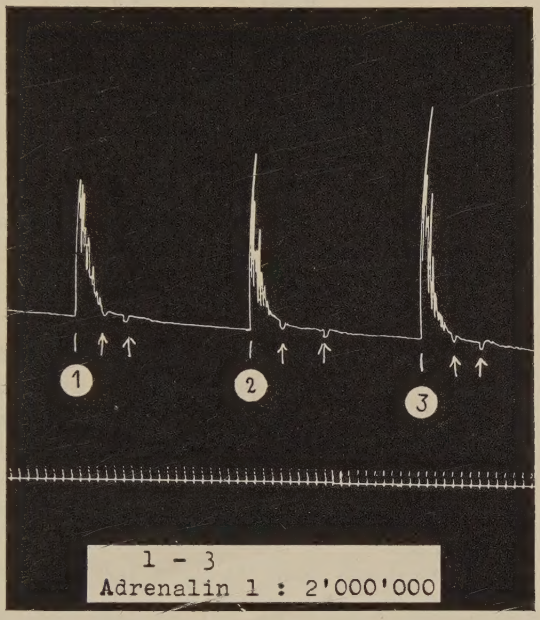


Abb. 2. Die Sensibilisierung der isolierten Samenblase des Meerschweinchens nach 3 aufeinanderfolgenden identischen Adrenalin-Reizen.

Diese Sensibilisierungserscheinung sowie das weitere Verhalten der Adrenalin-Empfindlichkeit der Samenblase erweist sich abhängig von dem *Intervall* zwischen den einzelnen Adrenalin-Verabreichungen. Als Kriterium für das geeignete Intervall dient einerseits das Auftreten der geringsten Sensibilisierung, anderseits der späte Eintritt von Ermüdungserscheinungen. Es wurden systematische Untersuchungen mit den Intervallen von 20, 30

Tabelle 2

Intervall zwischen den einzelnen Applikationen	Organ	Adrenalineffekt in mm Hubhöhe auf 1 : 2000000 Adrenalin		
		I. Applikation	V. Applikation	Sensibilisierung in %
20 Min.	1	26	31	
	2	18	23	
	3	29	31	
	Mittel	24,3	28,3	16
30 Min.	4	17	23	
	5	18	21	
	6	25	30	
	Mittel	20	24,6	23
40 Min.	7	11	17	
	8	27	35	
	9	27	36	
	Mittel	21,6	27,6	28

und 40 Minuten durchgeführt. In der Tabelle 2 sind die Resultate für jedes Intervall von 3 verschiedenen Organen wiedergegeben. Erfaßt ist die I. und die V. Adrenalin-Verabreichung. In allen Versuchen kam dieselbe Konzentration von 1:2000000 Adrenalin zur Anwendung. Die durchschnittliche Sensibilisierung beim Intervall von 20 Minuten ist mit rund 16% die kleinste, jene beim Intervall von 40 Minuten mit rund 28% – also nahezu dem Doppelten – die größte. Hinsichtlich der Sensibilisierung durch Adrenalin erweist sich somit für dieses Testobjekt das Intervall von 20 Minuten am günstigsten. Man erreicht so am raschesten die Phase einer *stabilisierten Empfindlichkeit*, während dies für die längeren Intervalle erst nach längerer Zeit zutrifft. Das ist für die quantitative Erfassung der Adrenalin-Hemmung deshalb von größter Bedeutung, weil die ideale Versuchsanordnung die Bestimmung des sympathikolytischen Effektes von 2 Präparaten an demselben Testobjekt im Sinne des Kreuzversuches erfordert. Dies setzt aber voraus, daß die Phase der stabilisierten Empfindlichkeit eine entsprechende Dauer hat.

Um diese Verhältnisse zu analysieren, wurden Dauerversuche mit repetierter Adrenalin-Verabreichung derselben Konzentration mit den Intervallen von 20, 30 und 40 Minuten durchgeführt. In der Tabelle 3 sind für jedes Intervall die Ergebnisse von je 4 Organen aufgeführt und je nach dem Intervall der Effekt der 1. mit der 11. bzw. 8. bzw. 7. Adrenalin-Verabreichung verglichen. Die angewandte Adrenalin-Konzentration ist stets 1:1000000. Es ergibt sich eine Phase der stabilisierten Empfindlichkeit nur

Tabelle 3

Intervall zwischen den Adrenalinverabreichungen	Adrenalineffekt von 1 : 1000000 Hubhöhe in mm		Vergleich der Empfindlichkeit zwischen der 1. und 11. bzw. 8. bzw. 7. Applikation
	1. Applikation	11. Applikation	
20 Min.	17	14	leichte Abnahme
	10	18	deutliche Zunahme
	13	13	—
	28	27	—
	1. Applikation	8. Applikation	
30 Min.	8	0	starke Abnahme
	41	18	starke Abnahme
	33	50	deutliche Zunahme
	8	19	starke Zunahme
	1. Applikation	7. Applikation	
40 Min.	20	16	leichte Abnahme
	32	28	leichte Abnahme
	15	15	—
	17	32	starke Zunahme

für das Intervall von 20 Minuten, während bei 30 und 40 Minuten Intervall die Anfangs- und Endreaktion große Differenzen aufweisen. Aus der Abbildung 3 ist ersichtlich, daß 7 hintereinander verabreichte gleiche Adrenalin-Reize mit einem Intervall von 20 Minuten in der stabilisierten Empfindlichkeitsphase stets denselben Reizerfolg auslösen. Einen weiteren Beweis für die Erzielung der günstigsten Versuchsbedingungen bei einem Intervall von 20 Minuten liefern Paralleluntersuchungen mit 20 und 30 Minuten Intervall unter sonst gleichen Versuchsbedingungen. Die Adrenalin-Verabreichung wurde so oft durchgeführt, bis eine deutliche Abnahme der Hubhöhe auftrat, sodann wurde das Mittel der Dauer für eine gleichmäßige Reizbeantwortung

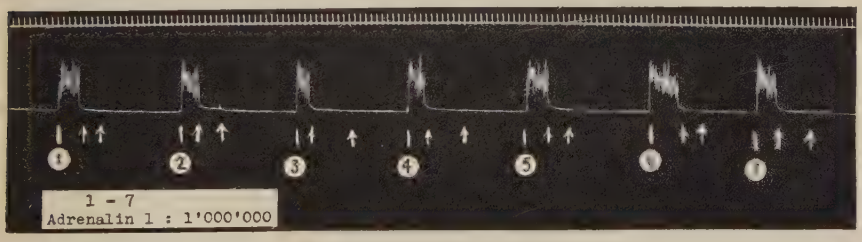


Abb. 3. Die Repetierbarkeit der Adrenalinwirkung an der isolierten Samenblase des Meerschweinchens bei einem Intervall von 20 Minuten zwischen den einzelnen Adrenalin-Reizen.

berechnet. Dieses beträgt für das Intervall von 30 Minuten 3,8 und für das Intervall von 20 Minuten *5,2 Stunden*. Die größte Häufigkeit betrug beim Intervall von 30 Minuten 3,5 Stunden, beim Intervall von 20 Minuten 7 Stunden. Aus diesen Untersuchungen über die Repetierbarkeit der Adrenalin-Reaktion resultiert, daß an der isolierten Samenblase bei einem Intervall von 20 Minuten eine *Phase der stabilisierten Empfindlichkeit von 5 bis 7 Stunden erreicht wird.*

Im Anschluß an diese Phase folgen *Ermüdungserscheinungen*. Sie äußern sich in der Unregelmäßigkeit und Abnahme des Reizerfolgs; sie sind auch durch längere Intervalle nicht mehr zu beheben. Im Zeitpunkt der auftretenden Ermüdung hingegen tritt an der Samenblase des Meerschweinchens auch im Ruhetonus fast regelmäßig mehr oder weniger ausgesprochene rhythmische Tätigkeit auf. Sie erscheint als typisches Begleitsymptom der Ermüdung. Weder in der Phase der Sensibilisierung noch in derjenigen der stabilisierten Empfindlichkeit ist unter unseren Versuchsbedingungen im Ruhetonus ein ausgesprochener Rhythmus vorhanden. Dies steht im Gegensatz zu den Erfahrungen von *Bacq* (14), der spontane Kontraktionen als Ausdruck einer Automatie beschreibt. Für unsere Absicht der quantitativen Analyse der Sympathikolyse ist das Fehlen der Automatie außerordentlich erwünscht; dadurch wird die Beurteilung des Adrenalin-Effektes nicht störend beeinflußt. Wie oben erwähnt, tritt ausgesprochene Automatie auf der Höhe der Adrenalin-Reaktion ein, die aber mit der sich selbst erschöpfenden Adrenalin-Wirkung oder sofort nach dem Auswaschen sistiert.

d) Der Einfluß des Glukose-Zusatzes.

In 14 Parallelversuchen mit und ohne $1^0/_{00}$ Glukose-Zusatz zum Ringer wurde der Einfluß der Glukose auf das Verhalten der Sensibilisierung bzw. des Reaktionsverlaufs bei wiederholter Adrenalin-Verabreichung mit 20 Minuten Intervall solange verfolgt, bis am einen der 2 jeweils miteinander verglichenen Testobjekte mit und ohne Glukose deutliche Ermüdungserscheinungen auftraten. Die angewandten Adrenalin-Konzentrationen für vergleichbare Reaktionen schwanken zwischen 1:500000 und 1:4000000. In der Tabelle 4 sind diese Versuche zusammengefaßt. Es ergibt sich, daß

Tabelle 4

Anzahl	Versuche ohne Glukose				Versuche mit Glukose	
	Sensibilisierung Glukose		Ermüdung Glukose		Spontane Kontraktion Glukose	
	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
14 Parallel-Versuche	0	6	14	6	2 × 0 6 × + 6 × ++	9 × 0 3 × (+) 2 × +

ohne Glukose in keinem Versuch, mit Glukose 6mal Sensibilisierung eintrat. Bei allen Organen mit Ringer ohne Glukose treten die Ermüdungserscheinungen zuerst auf, während nur 6 Organe mit Ringer mit Glukose gleichzeitig Ermüdungserscheinungen aufweisen. Auch die mit der Ermüdung auftretenden spontanen Kontraktionen stellen sich mit Ringer ohne Glukose häufiger und stärker ein als im Ringer mit Glukose. Der Zusatz von Glukose zum Ringer erweist sich somit bei der isolierten Samenblase des Meerschweinchens für die Erzielung einer langen gleichmäßigen Empfindlichkeit gegenüber Adrenalin von offensichtlichem Vorteil (Abb. 4).

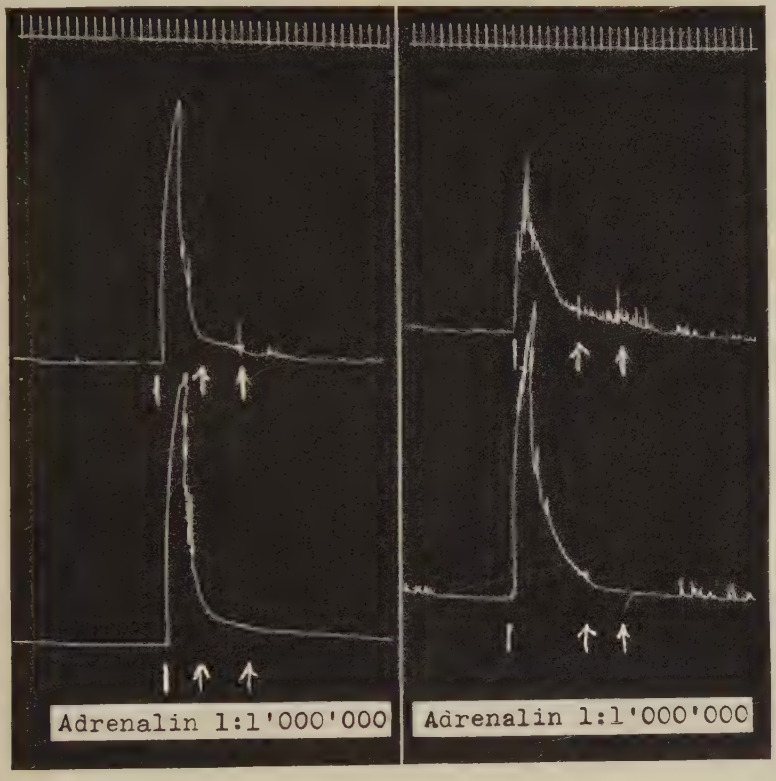


Abb. 4a Abb. 4b

Die Empfindlichkeit der isolierten Samenblase des Meerschweinchens bei Abb. 4a zu Beginn des Versuches, bei Abb. 4b gegen Ende des Versuches.
Obere Kurven: Nährbad ohne Glukosezusatz zum Ringer.
Untere Kurven: Nährbad mit Glukosezusatz zum Ringer.

Auf Grund vorliegender Analyse für die Erzielung einer stabilisierten Adrenalin-Empfindlichkeit der isolierten Samenblase des Meerschweinchens gelangen wir zu folgenden geeigneten Versuchsbedingungen:

O_2-durchperlte Ringerlösung mit 1‰ Glukose; Ruhepause von 30 Minuten vor Beginn der Versuche; Adrenalin-Konzentration 1:2000000–500000; Kontrolle der Sensibilisierung; Intervall zwischen den einzelnen Adrenalin-Verabreichungen 20 Minuten.

II. Der quantitative Nachweis der sympathikolytischen Wirkung der Mutterkornalkaloide mittels des Samenblasentestes

Die bisherigen Untersuchungen haben ergeben, daß die Mutterkornalkaloide an der isolierten Samenblase auch in Höchstdosen weder eine offensichtlich fördernde, noch eine hemmende Wirkung auslösen (*Rothlin* [16]). Erst der Belastungsversuch mit Adrenalin läßt eine Hemmung oder Aufhebung der Adrenalin-Wirkung durch die sympathikolytisch wirksamen Mutterkornalkaloide nachweisen. Die Wirkung dieser Alkaloide ist somit an der Samenblase immer nur latent. Dies steht im Gegensatz zu den Verhältnissen am isolierten Kaninchenuterus, bei welchem schon relativ schwache Konzentrationen eine Förderung der Automatie oder selbst eine lang anhaltende Tonussteigerung mit Rhythmus auslösen. Diese ausschließlich latente Wirkung der Mutterkornalkaloide auf die isolierte Samenblase ist deshalb für die Eignung der Samenblase als Testobjekt zur quantitativen Bestimmung von großem Vorteil, weil durch den Wegfall einer motorischen Eigenwirkung der Mutterkornalkaloide der Grad der Adrenalin-Hemmung recht exakt erfaßt werden kann. Die Wirkung der Mutterkornalkaloide äußert sich an diesem Testobjekt ausschließlich, je nach der verabreichten Dosis, in einer partiellen oder totalen Hemmung der kontrahierenden Adrenalin-Wirkung; nie besteht ein Umkehreffekt, wie das am Kaninchenuterus dann auftritt, wenn das Alkaloid einen tonuserhöhenden Effekt auslöst. Die Empfindlichkeit der isolierten Samenblase für Mutterkornalkaloide ist überraschend hoch; dies steht im Gegensatz zur geringen Adrenalin-Empfindlichkeit. Gerade diese hohe Empfindlichkeit der Samenblase gegenüber Sympathikolytika war die Veranlassung, die Eignung dieses Testobjektes für die quantitative Differenzierung der genuinen Mutterkornalkaloide und deren hydrierte Derivate zu überprüfen. Wie folgende Ausführungen zeigen, ist dies tatsächlich der Fall. Untersucht wurden folgende Mutterkornalkaloide, welche in Form weinsaurer Salze zur Anwendung kamen:

Ergotamin und Dihydroergotamin
Ergocristin und Dihydroergocristin
Ergocornin und Dihydroergocornin
Ergokryptin und Dihydroergokryptin

Zur Chemie dieser Alkaloide ist folgendes bemerkenswert. *Stoll* und *Hofmann* (17) haben nachgewiesen, daß das früher als wohldefiniertes Alkaloid betrachtete Ergotoxin kein einheitlicher Körper ist, denn aus Ergotoxin-Prä-

paraten verschiedener Herkunft konnten 3 Komponenten: Ergocristin, Ergocornin und Ergokryptin als wohldefinierte kristallisierte Komponenten isoliert werden. Das Komponentenverhältnis der verschiedenen Ergotoxinpräparate ist unregelmäßig, bald wiegt die eine, bald die andere vor, oder es kann eine derselben fehlen. Das spezifisch-chemische Unterscheidungsmerkmal dieser Alkaloide liegt ausschließlich im verschiedenen Aminosäuregehalt; Ergocristin enthält 1-Phenylalanin, Ergocornin 1-Valin, Ergokryptin 1-Leucin, die übrigen Komponenten sind identisch (*Stoll*, *Hofmann*, *Becker* [18]). Alle 4 genuinen Alkaloide werden durch Absättigung der leicht hydrierten Doppelbindung in der Lysergsäure, dem charakteristischen Bestandteil aller Mutterkornalkaloide, in wohldefinierte kristallisierte Dihydroverbindungen übergeführt (*Stoll* und *Hofmann* [19]). Ueber die pharmakologischen Eigenschaften dieser Dihydroderivate hat *Rothlin* (20) zusammenfassend berichtet. Hier interessiert vor allem die Beobachtung, daß die Dihydroderivate die für die genuinen Stammalkaloide charakteristische Uteruswirksamkeit praktisch völlig verloren haben, während die sympathikolytische Eigenschaft in stärkerem Ausmaße und in reinerer Form in Erscheinung tritt.

Die Lösungen der Alkaloide wurden täglich frisch hergestellt; 10 mg des weinsauren Salzes werden im Reagenzglas mit einem kleinen Ueberschuß von Weinsäure gut vermischt und zu einem Pulver verrieben. Zusatz von einigen Tropfen dest. H_2O und 0,1–0,2 ccm Alkohol und solange dest. H_2O, bis klare Lösung eintritt, Auffüllen mit 0,9% NaCl auf 1‰ oder 0,5‰ Lösung. Aus dieser Stammlösung wird mit 0,9% NaCl eine Verdünnung hergestellt, um durch Verabreichung von 0,5 ccm im Versuchsgefäß von 50 ccm die gewünschte Konzentration zu erreichen.

Der Gang der Untersuchung gestaltet sich folgendermaßen: In die 2 Versuchsgläschen jedes Thermostaten – es wird in der Regel mit 3 Apparaturen gleichzeitig gearbeitet – wird je eine Samenblase desselben Tieres eingespannt. Es stehen somit 3mal 2 miteinander zu vergleichende Testobjekte im Versuch. Nach halbstündiger Pause – Ruhetonus – wird im Abstand von 20 Minuten die Adrenalin-Empfindlichkeit der Organe festgestellt. Nach Erreichung der stabilisierten Empfindlichkeitsphase wird Alkaloid zugesetzt, das man 20 Minuten einwirken läßt; sodann wird das erste Mal ohne Auswaschen des Alkaloids, in Abständen von 20 Minuten, dieselbe Adrenalin-Dosis wie vor dem Alkaloidzusatz so oft verabreicht, bis die Adrenalin-Empfindlichkeit wieder normal wird. Kriterien für die Alkaloidwirkung sind Intensität und Dauer der Adrenalin-Hemmung. Die aufgeführten Alkaloide wurden in der Weise miteinander verglichen, daß Ergotamin als Standard für die genuinen Alkaloide Ergocristin, Ergocornin, Ergokryptin und für das Dihydroergotamin diente, das letztere für die 3 anderen dihydrierten Alkaloide. Die Alkaloiddosen des Standards und des zu vergleichenden Alkaloides werden nun so gewählt, daß die Hemmung mehr als 50% der ur-

sprünglichen Adrenalin-Wirkung beträgt. Bei diesem Vorgehen ist es zufolge der relativ leichten Auswaschbarkeit der Alkaloidwirkung an der Samenblase möglich, an denselben Testobjekten mindestens 2, oft sogar 3 Versuche durchzuführen. Es wurde deshalb nach dem Prinzip des sog. „Kreuzversuchs" verfahren, d. h. im 2. Versuch erhält das Organ, welches im ersten den Standard erhielt, das zu prüfende Alkaloid und umgekehrt. Für den quantitativen Nachweis wurde für das zu prüfende Alkaloid jene Konzentration gesucht, bei der die Wirkung mit jener des Standards übereinstimmte. Diese gleich wirksamen Konzentrationen werden gewissermaßen durch Eingabeln erhoben und durch 10–20 Versuche bestätigt.

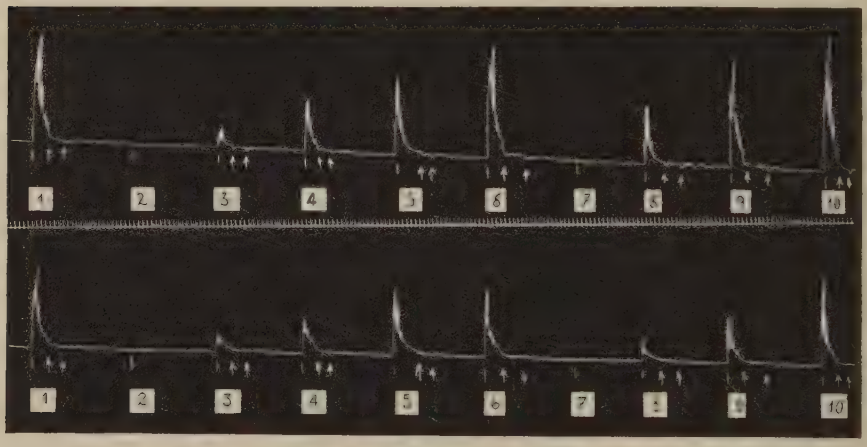


Abb. 5. Der Kreuzversuch.
Bei 1 3 4 5 6 8 9 10 Adrenalin-Reize 1 : 1000000
Bei 2 oben Ergotamin 1 : 60000000 Bei 7 oben Ergocristin 1 : 300000000
Bei 2 unten Ergocristin 1 : 300000000 Bei 7 unten Ergotamin 1 : 60000000

Wie aus dem Beispiel Ergotamin zu Dihydroergotamin der Tabelle 5, für welches die größten Versuchszahlen vorliegen, sich berechnet, wird eine Genauigkeit von $\pm$ 15% erreicht. Dies ist für eine biologische Titration recht annehmbar. Es ergibt sich mindestens die Genauigkeit des analogen Versuchs am isolierten Kaninchenuterus, dessen Genauigkeit $\pm$ 20% nicht übersteigt. Aus den über 400 Versuchen geben wir in der Abbildung 5 das Beispiel eines Kreuzversuchs wieder. Es ist der Standard Ergotamin mit Ergocristin verglichen; in beiden Fällen eine Dosis, welche zu über 50% Hemmung führt. Trotzdem ergibt sich schon nach 3maliger Adrenalin-Verabreichung wieder ein praktisch identischer Adrenalin-Effekt wie vor dem Alkaloidzusatz. Der Verlauf im angeschlossenen gekreuzten Versuch ergibt ganz analoge Verhältnisse. Wird somit eine für die Adrenalin-Hemmung zwar gut wirksame Alkaloiddosis verwendet, so ist die Dauer der Er-

holung bzw. völligen Reversibilität durchschnittlich 60–90 Minuten, und selbst bei einer Einschaltung einer Pause von 30–60 Minuten zwischen den 2 Untersuchungen kann der Kreuzversuch innerhalb nützlicher Frist durchgeführt werden. Zur Charakteristik der Alkaloidwirkung ist noch folgendes bemerkenswert. Es kommt vor, daß die Adrenalin-Wirkung am Schluß des ersten Versuchs mindestens so stark ist, ja evtl. stärker als zu Beginn, und trotzdem hemmen die Alkaloide im Kreuzversuch stärker. Das kann eine zweifache Ursache haben. Entweder sind die Testorgane gegenüber Adrenalin sensibilisiert, was nach unseren Ausführungen über die stabilisierte Adrenalinempfindlichkeitsphase mit einem besonderen Alkaloidwirkungsmechanismus zusammenhängen müßte. Wahrscheinlicher ist die Annahme, daß trotz scheinbar völliger Reversibilität eine latente Alkaloid-Restwirkung verbleibt, die erst bei erneutem Alkaloidzusatz in Erscheinung tritt. Schließlich ergibt sich aus den vielen Erfahrungen, daß zwischen der Empfindlichkeit gegenüber Adrenalin einerseits und Alkaloid anderseits keine feste Uebereinstimmung besteht, sondern daß entsprechend der individuellen Eigenart bald die Adrenalin-, bald die Alkaloid-Empfindlichkeit größer ist, oder daß beide parallel gehen. Durch einige Vorversuche wurde jeweils erst das approximative Wirkungsverhältnis des zu prüfenden Alkaloids zum Standard gesucht, und dann wurden in größeren Versuchsreihen unterschiedliche Konzentrationen innerhalb 15–30% durchgeprüft. Nur die Resultate der letzteren Versuche sind in der zusammenfassenden Tabelle 5 berücksichtigt. Die Reihenfolge der Alkaloide entspricht ihrer sympathikolytischen Wirksamkeit. Aufgeführt ist das Verhältnis der absoluten Konzentration des Standards und des zu vergleichenden Alkaloids. Die wirksamen Konzentrationen liegen zwischen 20 und 600 Millionen bzw. 0,05 und 0,0017 γ/ccm Versuchslösung, jene für Adrenalin betragen 0,5 und 2 γ/ccm Versuchslösung. Da das Molekulargewicht der untersuchten Mutterkornalkaloide – diese sind unter sich wenig verschieden – rund 3mal größer ist als jenes des Adrenalin, ist das Verhältnis der Anzahl Moleküle Alkaloid – welche für eine ausgesprochene Hemmung des Adrenalin notwendig ist – zur Anzahl Moleküle Adrenalin wie 1:60 bis 1800; mit andern Worten: *es braucht 60–1800mal weniger Moleküle Mutterkornalkaloid als Adrenalin, um die Wirkung des letzteren an der isolierten Samenblase in ausgesprochener Weise zu hemmen.* Das spricht einerseits für eine erstaunlich hohe spezifische Empfindlichkeit dieses Testobjektes gegenüber Mutterkornalkaloiden und anderseits für eine ungewöhnlich hohe Leistungsfähigkeit dieser biologischen Testmethode für den Nachweis der sympathikolytischen Wirkung dieser Alkaloide. Dies ergibt sich vor allem auch aus dem Vergleich mit der Leistungsfähigkeit der kolorimetrischen Methode nach *Keller* und deren Modifikation, sowie der Fluoreszenzmethode im Ultraviolett. Mit der ersteren gelingt es, 1/20 und im besten Fall 1/40 mg, mit der letzteren 1/100 mg pro ccm nachzuweisen; demgegenüber stehen 0,05–0,0017 γ/ccm mit der

Tabelle 5

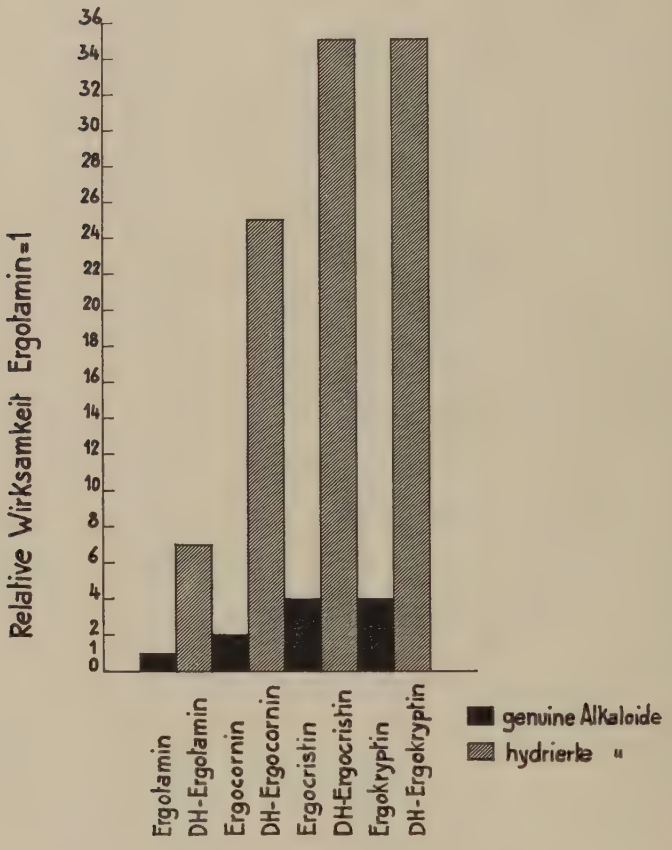
Miteinander verglichene Alkaloide	Konzentrationsverhältnis von Standard zu vergleichendem Alkaloid rel.	absol. in Millionen	Anzahl der Versuche	Adrenalin-Hemmung in % der Fälle: schwächer als Standard	gleich stark wie Standard	stärker als Standard	Relative Wirksamkeit Ergotamin = 1	
Ergotamin-St. / Ergocornin	1/1	100/100	15	13	0	86	2	
	2/1	100/200	26	3	72	23		
	3/1	75/225	25	64	22	4		
Ergotamin-St. / Ergokryptin	2/1	40/80; 45/90	12	8	8	80	4	
	3/1	30/90	29	20	37	41		
	4/1	40/160; 50/200	11	0	90	9		
	5/1	40/200	16	81	12	5		
Ergotamin-St. / Ergocristin	3/1	50/150	16	6	0	93	4	
	4/1	40/160; 50/200; 60/240	25	12	84	4		
	5/1	40/200; 50/250; 60/300	25	80	16	4		
Ergotamin-St. / DH-Ergotamin	6/1	25/150; 50/300	13	9	39	52	7	
	7/1	50/350	31	25	64	9		
	8/1	12,5/100; 30/240; 50/400	24	41	53	4		
	10/1	5/50	4	100	0	0		
DH-Ergotamin-St. / DH-Ergocornin	2/1	80/160; 120/240	12	17	33	50	Ergot. = 1: 25	DH-Ergot. = 1: 3,5
	3/1	150/450	7	0	100	0		
	4/1	100/400; 150/600	10	30	70	0		
	5/1	100/500	17	88	11	0		
DH-Ergotamin-St. / DH-Ergocristin	4/1	100/400	18	5	16	77	35	5
	5/1	50/250; 60/300; 70/350; 100/500	23	34	64	0		
	7/1	40/280; 50/350	23	95	4	0		
DH-Ergotamin-St. / DH-Ergokryptin	4/1	120/480	14	0	49	50	35	5
	5/1	100/500; 120/600	16	6	87	6		
	6/1	100/600	17	70	11	17		

biologischen Testmethode an der isolierten Samenblase. Letztere ist der *Keller*-Reaktion um das 500–1000fache und der Fluoreszenzmethode um das 200fache überlegen. Dabei ist für die biologische Methode nur der ungünstigste Wert für Ergotamin zugrunde gelegt. Für die übrigen stärker sympathikolytisch wirksamen Alkaloide ist der Unterschied entsprechend ihrer Wirksamkeit noch 2–35mal größer. Die *Keller*-Reaktion sowie die Fluoreszenzmethode basieren ausschließlich auf der Gegenwart der ungesättigten Lysergsäure, sie erfassen daher nur Differenzen des Molekulargewichtes. Das spielt aber nur für die Bestimmung von Ergobasin einerseits und von Ergotamin bzw. der Ergotoxin-Gruppe (Ergocristin, Ergocornin, Ergokryptin) anderseits eine wesentliche Rolle, indem das Molekulargewicht des Ergobasin kleiner ist als jenes der übrigen Alkaloide. Die kolorimetrischen Methoden sind von der intakten Lysergsäurekomponente abhängig, und alle anderen Veränderungen am Molekül, die selbst eine wesentliche Abnahme, ja sogar Unwirksamkeit bedingen können, beeinflussen das Resultat nicht. Somit können diese Methoden vom pharmakologischen Gesichtspunkte ganz irreführende Resultate zeitigen. Die biologische Titration hat aber außer der Ueberlegenheit der quantitativen Leistungsfähigkeit den Vorzug, die für Pharmakologie und Therapie interessante Differenzierung der sympathikolytischen Wirkung zu erschließen. Sie erlaubt, die Intensität der sympathikolytischen Wirkung des verschieden wirksamen Mutterkornalkaloids in bisher unübertroffener Weise quantitativ zu erfassen. Aus der Abbildung 6 ergibt sich folgende Wirkungsreihe der relativen Wirksamkeit der untersuchten Mutterkornalkaloide, wobei die Wirkung des Ergotamins mit 1 angenommen ist: *Ergotamin* (1)–*Ergocornin* (2)–*Ergocristin* und *Ergokryptin* (4), *DH. Ergotamin* (7)–*DH. Ergocornin* (25)–*DH. Ergocristin* und *DH. Ergokryptin* (35).

Die sympathikolytische Wirksamkeit der untersuchten Alkaloide entspricht der chemischen Einteilung, denn die 4 genuinen Alkaloide sind alle schwächer wirksam als ihre entsprechenden Dihydroderivate. Die relativen Unterschiede (Ergotamin = 1) liegen für die Gruppe der genuinen Alkaloide zwischen 1 bis 4, für jene der Dihydrokörper zwischen 7 bis 35. Der Vergleich der Wirksamkeit der genuinen und der entsprechenden hydrierten Alkaloide läßt folgende Regelmäßigkeiten erkennen. Die Reihenfolge der genuinen und hydrierten Alkaloide ist dieselbe, nämlich: Ergotamin–Ergocornin–Ergocristin und Ergokryptin resp. die entsprechenden hydrierten Alkaloide. Vergleichen wir das Verhältnis der Wirksamkeit zwischen genuinen und hydrierten Alkaloiden, so ergibt sich: Ergotamin zu DH. Ergotamin 1:7; Ergocornin zu DH. Ergocornin 1:12; Ergocristin und Ergokryptin zu DH. Ergocristin und DH. Ergokryptin 1:8. Durch die Absättigung der ungesättigten Bindung der Lysergsäure wird die sympathikolytische Wirkung ganz enorm gesteigert; die Zunahme beträgt für die 3 Alkaloide Ergotamin, Ergocristin und Ergokryptin übereinstimmend das 7- bis 8fache, für das Ergocornin das 12fache.

Abb. 6

Graphische Darstellung der relativen sympathikolytischen Wirksamkeit der vier genuinen Alkaloide und ihrer Dihydroderivate.



Die pharmakologische Prüfung mit anderen Methoden und an anderen Tierarten erst wird zeigen, ob diese an sich außerordentlich hohe und sehr verschiedene sympathikolytische Wirksamkeit der Mutterkornalkaloide allgemein zutrifft, oder ob nur eine besonders spezifische Reaktionsweise der isolierten Samenblase vorliegt. Die Entscheidung dieser Frage ist natürlich sowohl vom theoretischen als auch vom praktischen Standpunkt aus sehr wichtig, und es sind in diesem Laboratorium entsprechende Untersuchungen im Gange. Aber auch wenn dies nicht zutrifft, so stellt das ungewöhnlich hohe Differenzierungsvermögen dieses Testobjektes einen bemerkenswerten

Befund dar. Die praktischen Konsequenzen bzw. die Anwendung dieser Testmethode für den quantitativen Nachweis der Mutterkornalkaloide in galenischen Präparaten stellt eine weitere Aufgabe dar. Es besteht aber wegen der hohen Empfindlichkeit der isolierten Samenblase auf gewisse Pharmaka die Möglichkeit, daß in dem mannigfaltigen Gemisch von inerten, unspezifisch und spezifisch wirksamen Stoffen Störfaktoren vorliegen.

Schlußfolgerungen

1. Es werden die optimalen Versuchsbedingungen für eine stabilisierte Empfindlichkeit auf wiederholt verabreichte Adrenalin-Reize an der isolierten Samenblase des Meerschweinchens analysiert und beschrieben.

2. Auf eine Anfangspause zur Anpassung an das Milieu und Einstellung des Ruhetonus folgt zuerst (in den meisten Fällen) eine Phase der Sensibilisierung und dann eine Phase der stabilisierten Empfindlichkeit gegenüber Adrenalin während ca. 5 Stunden, worauf Ermüdungserscheinungen auftreten.

3. Die lange Dauer der stabilisierten Adrenalin-Empfindlichkeit erlaubt die Durchführung des sogenannten Kreuzversuchs, indem die Wirkung von Mutterkornalkaloiddosen, die eine mittelstarke Adrenalinwirkung um 30–50% hemmen, nach 60–90 Minuten vollständig reversibel ist.

4. Alle untersuchten Mutterkornalkaloide haben an sich nur eine latente Wirkung an der isolierten Samenblase, so daß weder Rhythmus noch Tonussteigerungen die Analyse stören. Die Wirkung wird erst durch den Nachweis der Adrenalin-Hemmung manifest. Keine Alkaloid-Konzentration führt zu einer Umkehr, stets nur zur partiellen oder totalen Adrenalin-Hemmung.

5. Die Empfindlichkeit der isolierten Samenblase gegenüber den Mutterkornalkaloiden ist erstaunlich hoch, sie ist 60–1800mal größer als jene gegenüber Adrenalin. Alle diese Wirkungsfaktoren erweisen sich für die quantitative Titration als sehr günstig. Die Genauigkeit der Methode beträgt $\pm$ 15%.

6. Mit dieser Methode wird folgende relative Wirkungsreihe der untersuchten Mutterkornalkaloide gefunden, wobei der Wert für Ergotamin gleich 1 gesetzt wird: Ergotamin 1, Ergocornin 2, Ergocristin und Ergokryptin 4, Dihydroergotamin 7, Dihydroergocornin 25, Dihydroergocristin und Dihydroergokryptin 35. Somit erweisen sich an der isolierten Samenblase des Meerschweinchens die genuinen Alkaloide schwächer wirksam als die entsprechenden Dihydroderivate. Der Unterschied beläuft sich auf das 7–12fache. Aus diesen Resultaten folgt eine überraschend gute Differenzierbarkeit der adrenalinhemmenden Wirkung mittels der Samenblase-Testmethode.

7. Die für die Adrenalin-Hemmung notwendigen Alkaloiddosen schwanken allgemein entsprechend der hohen Empfindlichkeit für die verschiedenen

Alkaloide zwischen 1:20–600000000 bzw. 0,05–0,0017 γ/ccm. Im Vergleich zur kolorimetrischen Reaktion nach *Keller* ist diese biologische Methode mindestens 500–1000mal, gegenüber der Fluoreszenzmethode 200mal empfindlicher.

8. Die beschriebene Methode dürfte für die praktische Anwendung zum quantitativen Nachweis von Mutterkornalkaloiden von Bedeutung sein.

1. *Sollmann, T.*, und *Brown, G. L.:* J. amer. med. Assoc. **45,** 229 (1905). – 2. *Dale, H. H.:* J. Physiol. **34,** 163 (1906). – 3. *Rothlin, E.:* Naunyn-Schmiedebergs Arch. **181,** 154 (1936); **184,** 69 (1936); Schweiz. med. Wschr. **68,** 971 (1938). – 3. *Rothlin, E.:* Helv. Physiol. Acta **2,** C 48 (1944). – 5. *Broom, W. A.*, und *Clark, A. J.:* J. Pharmacol. **22,** 59 (1923). – 6. *Rothlin, E.:* Rev. neurol. **1926,** 6; J. Pharmacol. **36,** 657 (1929). – 7. *Planelles, J.:* Naunyn-Schmiedebergs Arch. **105,** 38 (1925). – 8. *Issekutz, B. v.*, und *Leinzinger, M. v.:* Naunyn-Schmiedebergs Arch. **128,** 165 (1928). – 9. *Rothlin, E.:* Klin. Wschr. **4,** 1437 (1925). – 10. *Langley, J. N.*, und *Anderson, H. H.:* J. Physiol **19,** 124 (1896). – 11. *Waddel, J. A.:* J. Pharmacol. **8,** 551 (1916). – 12. *Müller, L. R.:* «Lebensnerven und Lebenstriebe», Berlin, Springer 1931, 3. Aufl. – 13. *Rothlin, E.:* Schweiz. med. Wschr. **64,** 188 (1934). – 14. *Bacq, Z. M.:* Arch. intern. Pharmacodyn. **47,** 123 (1934). – 15. *Rothlin, E.:* Biochem. Z. **111,** 219 (1920). – 16. *Rothlin, E.:* Rev. de Pharmacodyn. et de Thér. exp. **1,** 212 (1929). – 17. *Stoll, A.*, und *Hofmann, A.:* Helv. Chim. Acta **26,** 1570 (1943). – 18. *Stoll, A.*, und *Hofmann, A.:* Helv. Chim. Acta **26,** 1603 (1943). – 19. *Stoll, A.*, und *Hofmann, A.:* Helv. Chim. Acta **26,** 2070 (1943). – 20. *Rothlin, E.:* Helv. Physiol. Acta **2,** C 48 (1944).